



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A01C 1/06, A01N 63/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/30077 (43) Date de publication internationale: 16 juillet 1998 (16.07.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00041 (22) Date de dépôt international: 9 janvier 1998 (09.01.98)		(81) Etats désignés: AU, CA, IL, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 97/00219 10 janvier 1997 (10.01.97) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75338 Paris Cedex 07 (FR).			
(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (<i>US seulement</i>): DIGAT, Bernard [FR/FR]; Route de Montreuil-Juigné, F-49460 Canteigny-Epinard (FR).			
(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harlé et Phélie, 21, rue de La Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).			

(54) Title: READY-FOR-USE SEEDS TREATED WITH BACTERIA AND METHOD FOR OBTAINING THEM

(54) Titre: SEMENCES BACTERISEES PRETES A L'EMPLOI ET PROCEDE D'OBTENTION

(57) Abstract

The invention concerns seeds coated with a film-forming polymer, biodegradable, water-retaining and adhering to the seeds, compatible with the contained bacteria. The polymer further comprises at least an agent for rapidly increasing the intracellular osmotic pressure of the bacteria, thus preserving their viability until the seeds are sown.

(57) Abrégé

Semences pelliculées par un polymère filmogène, biodégradable, hydrorétenteur et adhérant à la semence, compatible avec des bactéries incluses. Le polymère comprend en outre au moins un agent augmentant rapidement la pression osmotique intracellulaire des bactéries, ce qui permet de conserver les bactéries viables jusqu'au moment du semis.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Irlande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroon	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		

« Semences bactérisées prêtes à
l'emploi et procédé d'obtention »

5 La présente invention est relative à des semences bactérisées prêtes à l'emploi. Elle a en outre pour objet un procédé d'obtention de telles semences.

Plusieurs genres et espèces bactériennes produisent des effets bénéfiques sur les plantes et leur environnement. Ainsi, les bactéries symbiotiques des légumineuses des genres *Rhizobium* et 10 *Bradyrhizobium* fixent l'azote de l'air et, en le restituant aux plantes, améliorent la croissance de celles-ci. De même, certaines bactéries non symbiotiques, telles que les *Pseudomonas fluorescens* et *Ps. putida*, les mutants avirulents des *Pseudomonas* (tels que *Ps.solanacearum*), les 15 *Agrobacterium* antagonistes et *A. tumefaciens*, les *Bacillus*, les *Azospirillum* favorisent la croissance des plantes et les protègent vis-à-vis des parasites fongiques et bactériens directement par des mécanismes d'antagonisme ou indirectement en induisant une résistance systémique (DIGAT, 1994, C.R.Acad.Agric. Fr.80.2:113-122). Enfin, d'autres bactéries telles que *Bacillus thuringiensis* secrètent des 20 toxines insecticides permettant une lutte biologique contre les insectes.

Les « plants » au sens large tels que les graines, les tubercules, les bulbes, les rhizomes et les boutures constituent des cibles favorables pour la bactérisation, car ils représentent un matériel de multiplication individualisé pouvant être colonisé efficacement par des 25 populations bactériennes bénéfiques.

Jusqu'à présent, le procédé le plus couramment utilisé pour la bactérisation consiste à immerger le matériel végétal dans une suspension bactérienne aqueuse juste avant la plantation. Cependant, les semences bactérisées par ce procédé doivent être semées 30 immédiatement car les cellules bactériennes ne peuvent survivre que quelques minutes à quelques heures à l'état déshydraté.

Afin de prolonger la survie des micro-organismes, on a proposé de constituer des inoculants, ou inoculats bactériens en fixant les bactéries sur des supports tels que des particules de silice et de 35 silicates, de sable, d'argile, de tourbe, de charbon poreux ou de sels

minéraux tels que des sulfate, phosphate ou carbonate de calcium (SMITH, 1992, Can.J. Microbiol. 38, 485-492).

La survie des bactéries dans et/ou sur ces supports est relativement satisfaisante lorsque ceux-ci sont humides (activité de l'eau AW > 0.9). Cependant, lors du mélange de ces inoculants avec les semences, on constate que, comme précédemment, la majorité de la population bactérienne ne survit pas plus de quelques heures à la surface des semences (BROCKWELL et BOTTOMLEY, 1995, Soil Biol. Biochem, 27, 4-5:683-697) dont l'AW est fréquemment inférieur à 0,5. Par conséquent, le mélange de ces inoculants ainsi conditionnés avec les graines doit être effectué juste avant le semis. Il en résulte des inconvénients majeurs et notamment une impossibilité de conserver les semences ainsi bactérisées.

Dans ce domaine de la bactérisation, dite indirecte, une amélioration a été apportée grâce à l'utilisation de microgranulés à base d'argile, de tourbe, ou d'alginate enrichis éventuellement par une source de carbone (brevets FR-2.519.022 et FR-2.695.929). Ces moyens permettent d'augmenter quelque peu la survie bactérienne, mais les microgranulés doivent encore être inoculés par l'agriculteur au moment de leur emploi au champ, c'est-à-dire juste avant le semis, et être disposés à proximité des semences dans la raie de semis.

Par ailleurs, afin d'améliorer l'adhérence des bactéries à la semence et leur résistance à la déshydratation, on a proposé de mélanger divers adhésifs et agents filmogènes, tels que des polymères artificiels (polyvinyle, polyacrylamide) ou naturels tels que les polysaccharides (cellulose et ses dérivés, alginates et ses dérivés, xanthane) avec les bactéries. La plupart de ces agents filmogènes ayant une capacité de rétention en eau assez élevée, cette propriété a été mise à profit pour améliorer la survie des bactéries.

On a aussi tenté d'améliorer la tolérance de certaines bactéries à la déshydratation en les cultivant dans des milieux contenant du mannitol, du sorbitol, du fructose de la dextrine ou de l'amidon (brevet européen O.O83.267).

Cependant, ces deux dernières solutions n'entraînent pas une augmentation suffisante de la survie des bactéries.

L'effet bénéfique sur les bactéries de diverses molécules osmorégulatrices a en outre été décrit, de manière générale, par exemple dans l'article de CSONKA (1989, *Microbiol. Rev.*, 53, 121-147).

5 L'utilisation de polysaccharides non réticulés pour stabiliser des microorganismes pour l'inoculation de graines est décrite dans le brevet US 5 292 507. Ce brevet mentionne que les solutions de polysaccharide peuvent contenir des agents osmorégulateurs, tels que des tampons. De tels agents ne sont pas de nature à leur permettre d'assurer une fonction d'osmoprotection.

10 La demande PCT WO 92/08 355 concerne elle aussi des semences inoculées. Les bactéries sont mélangées avec un argile inerte sous forme de poudre, et le mélange est mis à sécher. Selon un premier mode de réalisation, un osmoprotecteur est ajouté au moment du mélange des bactéries avec l'argile. Un séchage lent est alors nécessaire. Selon un autre mode de réalisation, l'osmoprotecteur est produit par les bactéries, ce qui nécessite un séchage encore plus lent. 15 Cette lenteur dans le séchage entraîne une imbibition de la semence, qui réduit son pouvoir germinatif.

20 Il ressort de l'analyse de l'état de la technique que l'on ne connaissait pas de moyen industriellement applicable permettant d'obtenir des semences présentant en surface une pellicule de bactéries et pouvant être stockées pendant les périodes comprises entre leur fabrication et les semis, sans pour autant perdre leurs propriétés bénéfiques.

25 Le demandeur s'est attaché à résoudre ce problème et a montré que des semences pelliculées par un polymère contenant un certain type d'agent augmentant la pression osmotique intracellulaire des bactéries, conservaient des bactéries viables jusqu'à leur semis.

30 La présente invention a donc pour objet des semences bactérisées prêtes à l'emploi, pelliculées par un polymère filmogène biodégradable, hydrorétenteur et adhérant à la semence, ledit polymère comprenant les bactéries et en outre au moins un agent osmoprotecteur ou augmentant la pression osmotique intracellulaire des bactéries.

35 Dans le contexte de la présente invention, le terme « pelliculage » doit être compris dans son sens habituel de la technique

des semences, c'est-à-dire comme signifiant une couche fine, d'épaisseur généralement comprise entre environ 10 et 100µm de préférence entre 20 et 50µm, déposée sur la semence. Dans une 5 semence « pelliculée », la forme extérieure est peu modifiée par rapport à la semence d'origine, ce qui n'est pas le cas des semences dites « enrobées », dans lesquelles la couche d'enrobage contenant la semence a une épaisseur supérieure à 1000 µm et modifie la forme extérieure de la semence, qui devient alors approximativement sphérique.

10 De manière préférentielle, l'agent augmentant la pression osmotique intracellulaire des bactéries est un acide aminé, tel que l'acide L-glutamique, la L-proline, la bétaïne, la L-sérine, ou l'un de leurs sels ou l'un de leurs dérivés. Il est préférentiellement l'acide L-glutamique. Cet agent peut être utilisé seul ou en mélange avec d'autres agents précités 15 ayant la même fonction.

Les bactéries susceptibles d'être incluses dans le pelliculage sont avantageusement des bactéries produisant des effets bénéfiques sur les plants issus des semences, ou sur leur environnement, et en particulier des bactéries symbiotiques ou non symbiotiques mentionnées 20 ci-dessus, telles que les bactéries des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus* et *Azospirillum*. Ces bactéries peuvent avoir divers effets sur les plantes et leur environnement. Elles peuvent fixer l'azote de l'air, protéger les plantes 25 des parasites fongiques et bactériens, ou encore sécréter des toxines insecticides.

Le polymère formant la pellicule est avantageusement un polymère filmogène biodégradable. Il peut être en particulier un chitosan, un alginate, une cellulose ou un de leurs dérivés. Il est choisi en fonction du type d'exopolysaccharide (EPS) de la bactérie que l'on souhaite utiliser.

Ainsi, pour les bactéries telles que les *Pseudomonas* et les *Bacillus*, on choisit un biopolymère cationique comme le chitosan ou mieux le chitosan-glutamate stérilisé par les rayons gamma. Ce dernier polymère forme à lui seul une microcapsule visible au microscope électronique autour des cellules bactériennes et confère rapidement aux 35

bactéries la capacité de mieux résister à la déshydratation. Il contient des ions glutamate en excès sous forme de sels (de sodium, de potassium, de magnésium) qui s'accumulent très rapidement dans les cellules bactériennes.

5 Pour d'autres bactéries, telles que les *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, on choisit de préférence un biopolymère anionique, tel qu'un sel d'alginate soluble auquel on adjoint de l'acide L-glutamique ou l'un de ses sels ou un autre acide aminé (L-proline, bétaïne, L-sérine) ou un de ses sels.

10 Pour les *Pseudomonas*, les *Bacillus*, les *Rhizobium* et les *Bradyrhizobium*, il est aussi possible de choisir une cellulose ou l'un de ses dérivés auquel on adjoint de l'acide L-glutamique ou l'un de ses sels ou un autre acide aminé (L-proline, bétaïne, L-sérine) ou un des sels de ces acides.

15 L'homme du métier peut à partir d'un simple test déterminer quel polymère doit être préférentiellement utilisé pour un type donné de bactérie.

20 Un tel test peut consister dans un premier temps à mélanger le polymère et les bactéries puis à observer l'évolution de la solution. Si les bactéries s'aggrègent en floculant, le polymère est considéré comme n'étant pas compatible. Au contraire, si aucune flocculation n'est observée on considère qu'il peut y avoir compatibilité. Cependant, pour vérifier précisément la compatibilité du polymère avec les bactéries, il est nécessaire de réaliser des tests selon des procédés standardisés bien connus de l'homme du métier afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) ou la concentration minimale bactéricide (CMB) du polymère.

25 De manière avantageuse, le revêtement formé autour de la semence constitue une pellicule ou enrobage présentant une épaisseur généralement comprise entre environ 10 et 100µm, de préférence entre 20 et 50µm.

30 Dans les semences pelliculées selon l'invention, les concentrations d'agent augmentant la pression intracellulaire des bactéries, en particulier d'acide L-glutamique, peuvent varier entre de larges limites au sein du polymère de pelliculage. Des indications

5 illustratives sont données dans les exemples qui suivent. Pour des essais préalables de routine, l'homme du métier peut optimiser la concentration par semence, en connaissant le nombre approximatif de semences par kg pour une espèce donnée et le volume de formulation nécessaire pour pelliculer un poids donné de semences.

10 Au sein de la formulation de pelliculage, les agents augmentant la pression intracellulaire des bactéries sont avantageusement à une concentration maximale. Préférentiellement, l'acide L-glutamique est présent dans le polymère de pelliculage à une concentration supérieure à environ 8 g/l.

15 La proline est avantageusement comprise à une concentration supérieure à environ 150 g/l, la bétaïne à une concentration supérieure à environ 1600 g/l et la sérine à une concentration supérieure à environ 50 g/l.

20 Dans les semences pelliculées selon l'invention, les quantités de bactéries par semence varient selon la nature des bactéries et la surface et le volume de la semence. Des essais de routine sont à la portée de l'homme du métier pour déterminer le nombre optimal de bactéries effectivement présentes dans la pellicule entourant la semence.

25 La présente invention présente l'avantage de combiner:

- d'une part la formation d'une microcapsule autour des cellules bactériennes ralentissant les échanges d'eau et de gaz avec le milieu extérieur, et

30 - d'autre part le déclenchement d'une rapide élévation de la pression osmotique intracellulaire dans les cellules bactériennes.

Les semences bactérisées peuvent être obtenues par un procédé de fabrication comprenant les étapes suivantes:

35 - mélange du polymère et de l'agent osmoprotecteur, puis mélange avec les bactéries,
- application sur les semences de la formulation ainsi obtenue , et par pelliculage et
- séchage des semences.

De manière avantageuse, l'application de la formulation et le séchage sont effectués dans un processeur à lit fluidisé ou dans une turbine de pelliculage.

5 Selon un mode de mise en oeuvre particulier, les souches bactériennes sont conservées à l'état lyophilisé et doivent être réactivées dans un milieu nutritif riche avant d'ensemencer le milieu de culture définitif convenant à l'espèce bactérienne. Dans un fermenteur à grande capacité, le milieu de culture est agité en continu pour optimiser l'oxygénéation. Les conditions de température et de pH sont déterminées 10 pour chaque espèce bactérienne. L'inoculum bactérien est constitué lorsqu'on atteint la fin de la phase stationnaire : sa concentration finale doit être supérieure à 10^{10} cfu/ml.

15 Le biopolymère stérilisé est solubilisé dans l'eau stérile à sa concentration spécifique en présence du ou des agents augmentant la pression osmotique, par exemple d'acide glutamique à la concentration minimale de 8 g/l. Il est nécessaire d'ajuster le pH d'environ 6,2 à 6,5 (selon le polymère utilisé) préférentiellement à l'aide de KOH 10N en évitant toute précipitation du polymère. Enfin, la suspension bactérienne concentrée contenant le ou les agents osmoprotecteurs à la même 20 concentration que dans le polymère est doucement dissoute dans le polymère dans un rapport en volume voisin de 1:1. On laisse reposer au moins 1 heure à la température du laboratoire.

25 Pour le pelliculage des semences, on utilise une turbine industrielle, ou mieux un processeur à lit fluidisé, ou tout autre appareil convenant à cette opération. Durant ces opérations il est nécessaire de veiller au réglage de la température, qui ne doit pas être supérieure à 30°C, d'éviter tout colmatage de filtre ou de collage des semences entre elles. Le séchage doit être le plus rapide possible.

30 La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent, avec référence aux dessins annexés sur lesquels:

35 La figure 1 représente la survie de bactéries *Pseudomonas fluorescens* G92 sur des semences de tournesol conservées à 12°C en fonction du nombre de jours, les semences ayant été pelliculées en lit fluidisé.

La figure 2 représente la survie de bactéries *Pseudomonas putida* TL5 sur des semences de tournesol conservées à 12°C, les semences ayant été respectivement pelliculées en lit fluidisé et en turbine.

5 Les figures 3A, 3B et 3C mettent en évidence les quantités de glutamate, déterminées par méthode enzymatique, dans différentes conditions,

10 la figure 3A représentant l'évolution de la quantité moyenne d'acide L-glutamique, dans ou sur 10^{10} cellules bactériennes de *Pseudomonas putida* TL5, en fonction du temps d'incubation dans l'osmoprotecteur(1, 30, et 60 minutes),

15 la figure 3B représentant le pourcentage moyen d'acide L-glutamique et de ses sels (glutamates) dans la formulation à pH 6,08 à deux concentrations en chitosan (3 et 6%),

la figure 3C représentant la quantité d'acide L-glutamique et de ses sels (glutamates) présente sur des semences de tournesol pelliculées, après quatre mois de stockage, respectivement avec et sans bactéries *Pseudomonas fluorescens* G 92,

20 la figure 4 illustre la survie de *Bradyrhizobium japonicum* G49 sur des semences de soja conservées à 12°C , et pelliculées respectivement par un polymère d'alginate de sodium (Manucol) et un dérivé cellulosique (Sepiret).

25 Les figures 5A et 5B illustrent la survie de bactéries *Pseudomonas putida* TL5, en présence et en absence d'acide L-glutamique, respectivement dans de l'alginate de sodium (Manucol) et dans un polymère cellulosique (Sepiret). Le nombre de bactéries est exprimé en cfu/ml.

EXEMPLE 1

30 Bactérisation des semences par les *Pseudomonas*

Afin de constituer l'inoculum, les bactéries sont cultivées dans le milieu LPG (extrait de levure 5 g/l, peptone 5 g/l, glucose 10 g/l) ou dans le milieu B de King (KING, WARD and RANEY, 1954, J. Lab. Clin. Med., 44:301-307) ou dans le milieu de MISAGHI (MISAGHI et

GROGAN, 1969, *Phytopathology* 59: 1436-1450) à 26-27°C durant 60 à 72 heures avec agitation en continu et pH régulé à 6,5-6,8. La fin de la phase stationnaire étant atteinte, on concentre la suspension bactérienne de façon à obtenir une concentration utile d'environ 10^{11} cfu/ml.

On prépare une solution de chitosan-glutamate stérilisé (pureté > 95%) dans de l'eau stérile à la concentration de 6%. Le pH de la solution de biopolymère est ajusté à 6,2 à l'aide de KOH 10N. La suspension aqueuse bactérienne concentrée est mélangée doucement avec le biopolymère dans un rapport 1:1 en volume. On laisse reposer au moins 1 heure à la température du laboratoire.

On mesure l'activité de l'eau (AW) ou l'humidité relative d'équilibre (HRE) d'un échantillon de semences à bactériser, l'optimum de AW à la fin de l'opération de pelliculage se situant vers 0,50. Les semences sont placées dans une turbine industrielle de type DUMOULIN ou dans un processeur à lit fluidisé muni d'une cuve WURSTER. On règle les paramètres suivants:

- * température de l'air à l'entrée: 30°C,
- * température de l'air à la sortie : 20°C,
- * pression de pulvérisation: 0,5 bar (lit fluidisé) ou 2 bars (turbine),
- * diamètre des buses de pulvérisation: 1,0 à 1,2 mm,
- * pression de ventilation: -115 Pa (lit fluidisé) ou -200 Pa (turbine),
- * débit moyen de la pompe: 10 ml/minute.

Le volume de formulation nécessaire varie en fonction du type de semences. Ainsi 200 à 300 litres de formulation sont nécessaires pour pelliculer 1 tonne de semences de tournesol.

Lorsque le pelliculage est terminé, on procède à la numération sur le milieu B de King gélosé de la population survivante sur la semence. On suit cette survie de la population bactérienne jusqu'à la commercialisation finale de façon à garantir à l'utilisateur une quantité de bactéries survivantes estimée suffisante pour produire l'effet biologique recherché. Les essais de pouvoir germinatif sont effectués selon les normes de l'ISTA (International Seed Testing Association).

5 Selon cet exemple, à 12°C, la survie de *Pseudomonas fluorescens* G92 en surface des semences de tournesol, pelliculées à l'aide de la technologie du lit fluidisé selon le procédé décrit ci-avant, est suivie durant plus de 550 jours (figure 1). On observe qu'à cette date la perte de population est seulement d'1.5 log cfu.

10 D'autre part, le pelliculage des semences de tournesol à l'aide de la même formulation contenant *Pseudomonas putida* TL5 à 3×10^{10} cfu/ml est effectué simultanément dans un processeur à lit fluidisé (marque GLATT) et dans une turbine (marque DUMOULIN). La survie de la population bactérienne fixée sur les semences est suivie durant 70 jours (figure 2). On observe qu'à cette date la perte de population n'est que légèrement supérieure à 1 log cfu.

15 La quantité d'acide L-glutamique et de glutamates a en outre été mesurée dans diverses conditions et à différents moments comme décrit par Bernt et Bergmeyer (1965, Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analysis, 384-388, 2nd printing). La figure 3A illustre l'évolution de la quantité d'acide L-glutamique absorbé ou adsorbé par 10^{10} cellules bactériennes en fonction du temps d'incubation dans la solution. La figure 3B représente la variation de la quantité d'acide glutamique et de glutamates dans la formulation en fonction de la concentration en chitosan. La figure 3C est une comparaison de l'évolution des quantités de glutamate respectivement sur des semences pelliculées sans et avec bactéries après 4 mois de stockage.

25 **EXEMPLE 2**

Bactérisation des semences de légumineuses par Rhizobium et Bradyrhizobium

30 Afin de constituer l'inoculum, les bactéries sont cultivées: pour les *Rhizobium* (exemple; *Rhizobium meliloti* souche 2011) dans le milieu YEM (VINCENT, 1970, A manual for practical study of root-nodule bacteria, IBP Handbook n°15, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 169 pp.) durant 6 jours à 28°C en agitation continue, pH régulé à 7 et pour les *Bradyrhizobium* (exemple: *B japonicum* souche G49, IARI SB16,

New Delhi) dans le milieu de Burton (BURTON, 1976, *Symbiotic nitrogen fixation*, ed. P.S. Nutman, Cambridge University Press, 175-189) durant 8 jours à 30°C en agitation continue, pH régulé à 6,5.

5 La fin des phases stationnaires étant atteinte, les suspensions bactériennes sont concentrées de façon à obtenir une concentration utile d'environ 10^{11} cfu/ml.

10 Pour la formulation, on utilise soit de l'alginate de sodium stérile (Manucol commercialisé par Kelco International) à la concentration de 1,0% , soit un dérivé cellulosique (Sepiret O7G commercialisé par Seppic) à 8% dans lesquels on ajoute de l'acide L-glutamique stérilisé (Sigma, pureté 99-100%) à la concentration finale de 0.86 %. On ajuste 15 le pH de la solution à 6,4 à l'aide de KOH 10N. La suspension aqueuse bactérienne concentrée contenant l'acide glutamique à 0,86% est doucement mélangée à cette solution de polymère dans un rapport 1:1 en volume. On laisse reposer au moins 1 heure à la température du laboratoire.

On procède aux mêmes étapes que dans l'exemple 1 pour le pelliculage.

20 Le volume de formulation nécessaire varie en fonction du type de semence. Par exemple, pour pelliculer 1 tonne de semence de soja, environ 1000 litres de formulation sont nécessaires.

25 Lorsque le pelliculage est terminé, on procède à la numération, respectivement sur milieu YEM ou milieu de BURTON gélosés, de la population survivante sur la semence et on réalise des tests de nodulation (en conditions contrôlées) en notant le nombre de nodosités apparues sur les plantes. Les essais de pouvoir germinatif sont effectués selon les normes de l'ISTA (International Seed Testing Association).

Selon cet exemple, à 12°C, la survie de *Bradyrhizobium japonicum* G49 en surface des semences de soja pelliculées à l'aide

d'un processeur à lit fluidisé selon le procédé décrit ci-dessus a été suivie durant 70 jours (figure 4). On observe qu'à cette date la perte de population est de 4 log environ dans les deux polymères (Manucol et Sepiret) utilisés pour la formulation. Chaque semence de soja devant être porteuse de 10^6 bactéries pour induire une nodulation suffisante, on estime que cette quantité est disponible jusqu'au 70ème jour.

EXEMPLE 3:

Influence de la présence d'acide glutamique dans le revêtement sur la survie des bactéries.

10

Des tests comparatifs ont été effectués sur des supports inertes stériles représentés par des pastilles de « Téflon » de diamètre 10 mm afin de déterminer l'influence de l'acide L-glutamique sur la survie des bactéries.

15

Dix microlitres d'un mélange d'alginate (Manucol) et de bactéries *Pseudomonas putida* TL5 à 10^4 CFU/ml, avec ou sans acide L-glutamique (8g/l) ont été déposés sur chaque pastille. Les pastilles ont été placées dans des boîtes de Nunclon delta stérilisées aux rayons gamma à raison de 12 pastilles par traitement (3 répétitions de 4). On a soumis les pastilles inoculées à 2 h et 4 h de déshydratation par ventilation d'air sec à 25°C. Puis le nombre de bactéries (cfu/ml) a été déterminé par la méthode classique des dilutions sur le milieu B de King.

20

Les résultats sont représentés sur la figure 5A.

25

Ils montrent clairement que l'ajout d'acide L-glutamique à l'alginate permet la survie des bactéries après 4 h de déshydratation, alors qu'en absence d'acide L-glutamique les bactéries ne survivent pas.

Des expérimentations comparables ont été effectuées avec la même souche bactérienne à 10^6 CFU/ml, dans un polymère cellulosique

(Sepiret O7 G). La survie des bactéries a été estimée après 1 h et 2h de déshydratation dans les mêmes conditions que pour la figure 5A.

La conclusion est similaire pour ce polymère, l'acide L-glutamique exerçant un effet bénéfique très net sur la survie des bactéries, comme le montre la figure 5B.

REVENDICATIONS

5 1. Semence bactérisée prête à l'emploi pelliculée par un polymère filmogène biodégradable, hydrorétenteur et adhérant à la semence, comprenant les bactéries, ledit polymère comprenant en outre au moins un agent osmoprotecteur ou augmentant la pression osmotique intracellulaire des bactéries.

10 2. Semence selon la revendication 1 caractérisée en ce que ledit agent est un acide aminé.

15 3. Semence selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que ledit agent est l'acide L-glutamique, la L-proline, la bétaïne, la L-séroline ou l'un de leurs sels ou l'un de leurs dérivés, ou un mélange desdits acides, sels ou dérivés.

4. Semence selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que ledit agent est l'acide L-glutamique, l'un de ses sels ou l'un de ses dérivés, et en ce qu'il est compris à une concentration supérieure à environ 8 g/l.

20 5. Semence selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les bactéries sont du genre *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus* ou *Azospirillum*.

6. Semence selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que ledit polymère est un chitosan, un alginate, une cellulose, ou un de leurs dérivés.

25 7. Semence selon l'une des revendications 1 à 6 caractérisée en ce que la pellicule entourant la semence possède une épaisseur comprise entre environ 10 et 100 µm, de préférence entre environ 20 et 50 µm.

30 8. Procédé de fabrication de semences bactérisées selon l'une des revendications 1 à 7 comprenant les étapes suivantes:

- mélange du polymère et de l'agent osmoprotecteur, puis mélange avec les bactéries,
- application sur les semences par pelliculage de la formulation ainsi obtenue,
- 5 - séchage des semences.

9. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que l'application et le séchage sont effectués dans un processeur à lit fluidisé ou dans une turbine industrielle.

1/5

Fig. 1

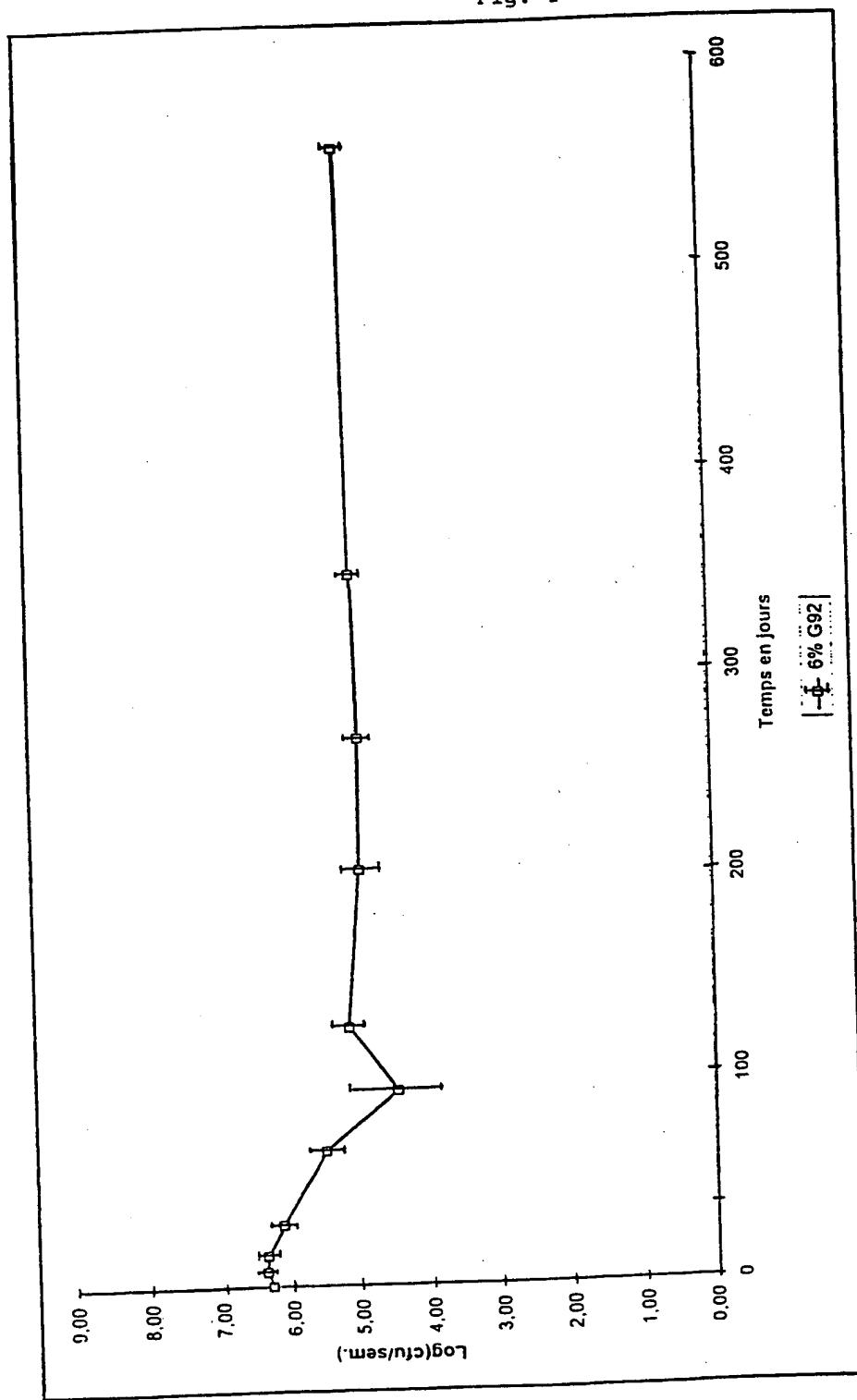
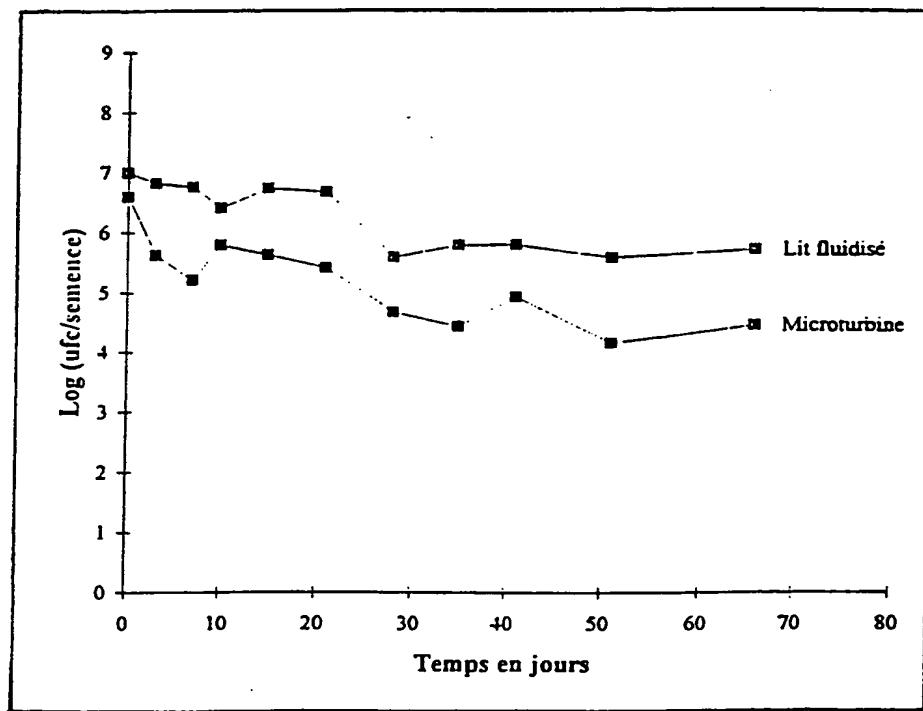


Fig. 2



3 / 5

FIG.3A

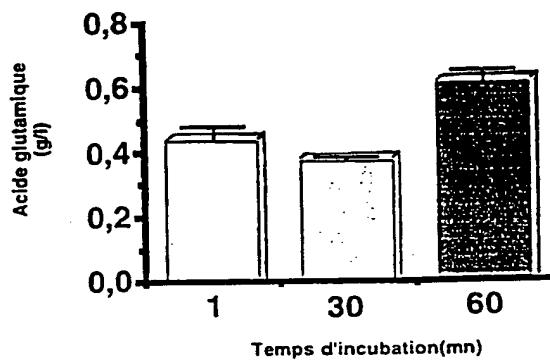


FIG.3B

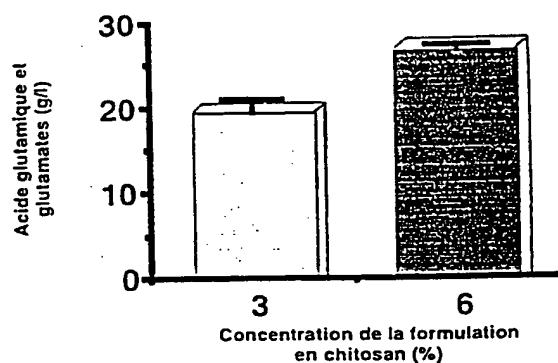
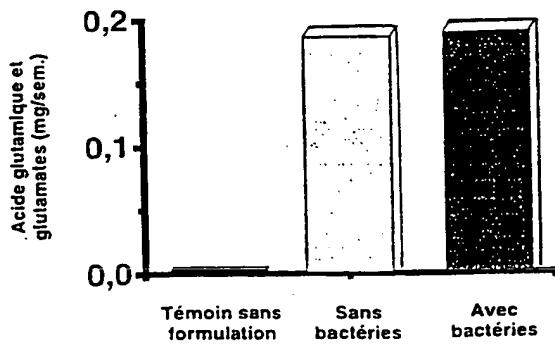
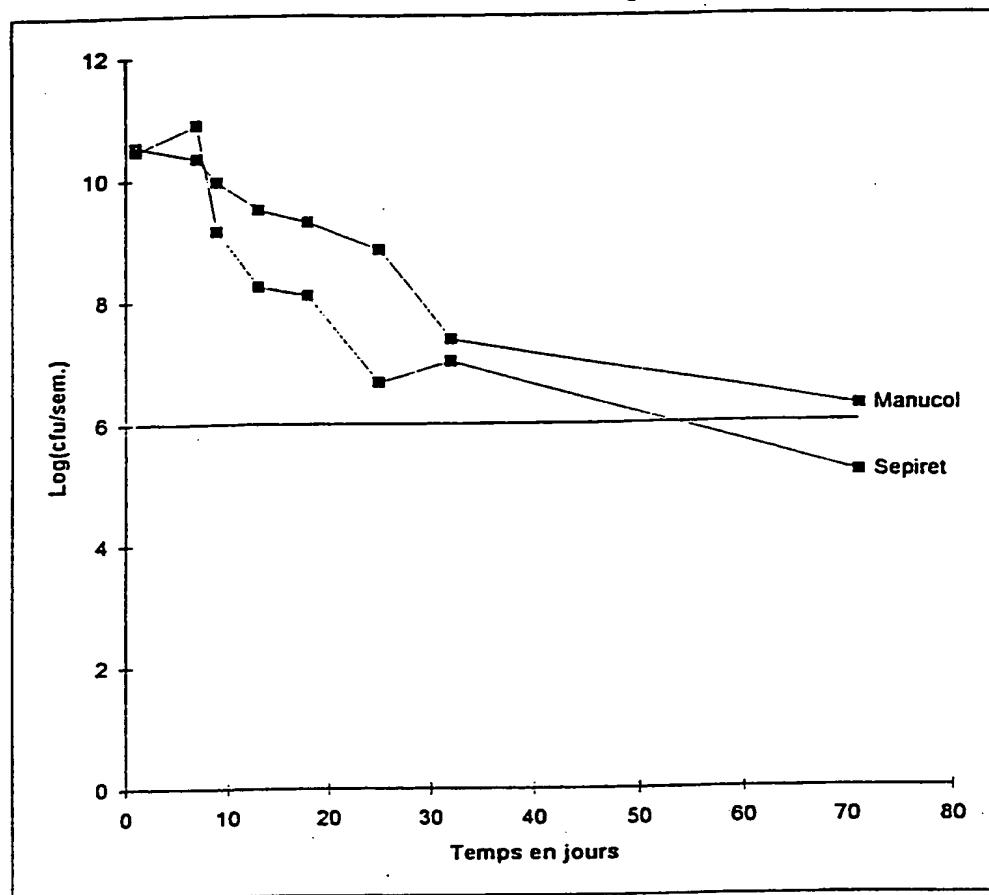


FIG.3C



4 / 5

Fig. 4



5/5

Fig. 5A

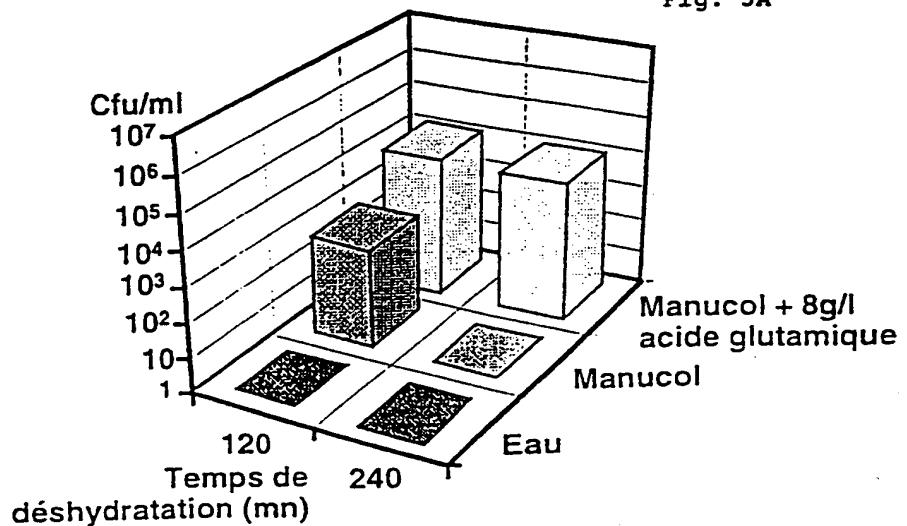
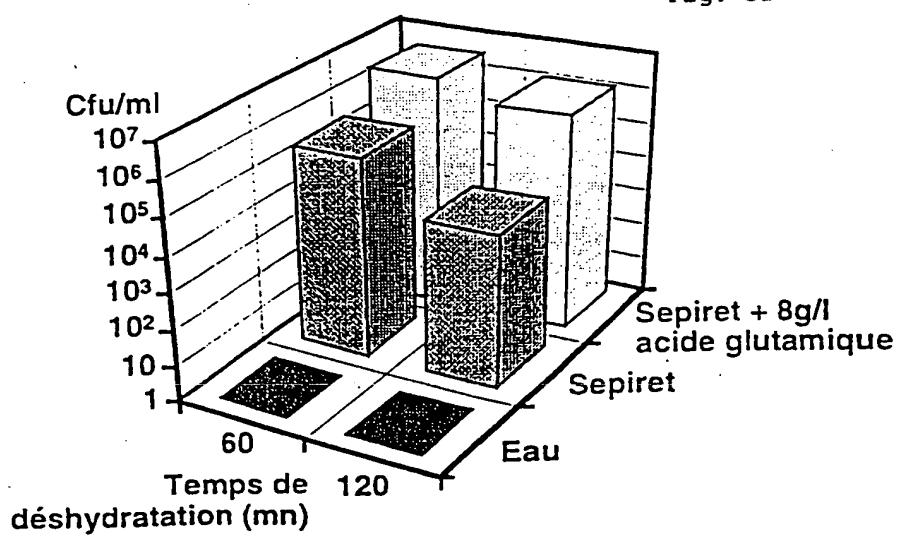


Fig. 5B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/00041

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 A01C1/06 A01N63/00

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A01C A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 292 507 A (IMPERIAL OIL LIMITED) 8 March 1994 see column 1, line 22 - line 24 see column 5, line 16 - line 21 see claims 1-12 --- WO 92 08355 A (LIPHATECH INC) 29 May 1992 see page 7, line 30 - page 8, line 17 see example 10 see claims 1-16 -----	1-9
X		1-9

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 March 1998

Date of mailing of the international search report

13/03/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fort, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 98/00041

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5292507 A	08-03-94	CA 1300538 A	12-05-92
WO 9208355 A	29-05-92	US 5695541 A CA 2073507 A EP 0510188 A MX 9102043 A	09-12-97 14-05-92 28-10-92 31-05-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dern. Internationale No
PCT/FR 98/00041

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A01C1/06 A01N63/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A01C A01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 292 507 A (IMPERIAL OIL LIMITED) 8 mars 1994 voir colonne 1, ligne 22 - ligne 24 voir colonne 5, ligne 16 - ligne 21 voir revendications 1-12 ----	1-9
X	WO 92 08355 A (LIPHATECH INC) 29 mai 1992 voir page 7, ligne 30 - page 8, ligne 17 voir exemple 10 voir revendications 1-16 -----	1-9

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 5 mars 1998	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 13/03/1998
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Fort, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem: Internationale No

PCT/FR 98/00041

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5292507 A	08-03-94	CA 1300538 A	12-05-92
WO 9208355 A	29-05-92	US 5695541 A CA 2073507 A EP 0510188 A MX 9102043 A	09-12-97 14-05-92 28-10-92 31-05-94